

Ancient DNA from wild boar fossils in Guangxi and its implication for pig domestication

YIN Shuai¹ SHENG Gui-Lian^{1*} HOU Xin-Dong¹ ZHU Min² DU Ming¹
JIN Chang-Zhu² LAI Xu-Long¹

(1 State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences Wuhan 430074

* Corresponding author: glsheng@cug.edu.cn)

(2 Key Laboratory of Vertebrate Evolution and Human Origins of Chinese Academy of Sciences, Institute of Vertebrate Paleontology and Paleoanthropology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100044)

Abstract Pig domestication has long been an issue of interest in archaeology and genetics. As the real-time carrier of the genetic information for historical or extinct animals, ancient DNA may provide continuous molecular evidence for tracing the history of domestication. We collected 30 wild boar fossils of Late Pleistocene from three caves in Guangxi, Southwest China. Through the use of the fragmented ancient DNA sequences from southern China and homologous sequences of both domestic and wild boars across Asia and Europe, we reconstructed the Network phylogeny of the pig family. The results agree with the multiple-origin-center-theory for pig domestication. Moreover, we found that the wild boar individual from Guangxi clustered into the European haplotype instead of the Asian one. It seems that there is no genetic contribution from the wild boar to the domesticated pig in Guangxi. We suggest that the previous opinion of independent pig domestication event has occurred in this area need reconsideration and further investigation.

Key words phylogeography, pig domestication, ancient DNA

广西地区野猪化石古DNA及猪的驯化初探

尹 帅¹ 盛桂莲^{1*} 侯新东¹ 朱 敏² 杜 明¹ 金昌柱² 赖旭龙¹

(1 生物地质与环境地质国家重点实验室, 中国地质大学 武汉 430074 *通讯作者)

(2 中国科学院古脊椎动物与古人类研究所, 中国科学院脊椎动物演化与人类起源重点实验室 北京 100044)

摘要: 猪的起源驯化一直是人们关注的问题, 古DNA技术可为家猪起源驯化研究提供历史分子证据。为探讨广西地区更新世晚期野猪与当地家猪的关系, 我们收集了广西壮族自治区晚更新世三个不同地点的30个猪科动物化石样品, 测定了这些样品的线粒体DNA细胞色素b基因的核苷酸序列。结合现代不同品种家猪和野猪DNA同源序列信息, 构建Network网

络结构图,进一步证实了家猪多地起源学说。研究显示广西古代野猪与现存欧洲猪的基因型最为接近,属于欧洲单倍型H1,从而推测其对该地区现代家猪的遗传贡献可能较低,对考古形态学研究中关于广西地区家猪独立起源的推测提出了质疑。

关键词:系统地理学,猪的驯化,古DNA

中国法分类号:Q915.876 文献标识码:A 文章编号:1000-3118(2013)04-0321-10

野猪(*Sus scrofa*)是最早被人类驯化的野生动物之一,与人类活动关系十分密切,为人类最主要的肉类食物来源。猪主要在灌木丛和草坡的林缘地带活动,与人类生活的环境一致。因此,对猪驯化历史的研究,可以揭示人类活动的轨迹,为人类的迁移及人类社会从狩猎采集到农耕生活模式的转变提供佐证。Dobney等通过传统的形态学和考古学研究推断猪最早的驯化发生在9 ka前(李相运,1998)。近年来分子生物学的发展为家猪驯化研究提供了又一重要途径,更加细致直观地说明了亚洲家猪和欧洲家猪各自独立的起源(Giuffra et al., 2000; Kijas and Andersson, 2001)。然而,由于驯化早期猪的骨骼形态变化极其微小,属于驯化早期阶段的骨骼十分稀少并且保存非常破碎,基于形态学和考古学的研究因而受到一定局限。在分子生物学方面,由于现代家猪性状的遗传及基因交流存在长期的人工干预,仅通过对现代猪样品的分子生物学研究,并不足以真实反映家猪驯化的整个过程(崔银秋等,2010)。近年来,随着古DNA技术的兴起,来自生物化石的古DNA信息可以克服时间束缚,让研究者直接了解生物群体历史变化动态,为探讨家猪的起源问题提供了很好的切入点。

猪的古DNA研究起步很晚,Watanobe et al. (2001)最早进行此类研究,测定了公元5~8世纪礼文岛出土属于鄂霍茨克文化的Kabukai遗址中发掘的42个库页猪样本的线粒体控制区序列,通过与日本、蒙古和我国等地区现代猪DNA序列的比对,推测该遗址出土的古代库页猪由东北亚地区的库页岛和漠河盆地由东北亚大陆的商贸交易引入。Watanobe et al. (2002)分析了冲绳岛12个考古遗迹出土的33例猪骨样品的574 bp的线粒体基因组(mitochondrial DNA, mtDNA)序列,认为至少在公元前3世纪,亚洲大陆的家猪已被引入到冲绳岛。Watanobe et al. (2004)测定了日本佐渡岛13个绳纹时代遗址中的65例猪个体线粒体控制区574 bp序列,表明此地的古代猪应该是原生种群;通过与佐渡岛现生猪种的比较,推测此岛原生猪种很可能于2 ka前灭绝。Larson et al. (2005)利用博物馆保存的猪骨线粒体基因组研究了世界范围内家猪的起源和驯化,提出全球家猪多地起源观点。研究人员还通过分析欧洲221个古代和323个现代猪样本的线粒体基因组高变控制区序列,表明源自近东的家猪在新石器时代进入欧洲,但本地的欧洲野猪也可能就在近东家猪引进之后被驯化,并在整个欧洲迅速地取代了引进的近东家猪。这一研究为还原农业经济由新石器时代起源地近东地区向西(欧洲)迁徙的历史增加了更多的证据(Larson et al., 2007)。2010年Larson汇同中国学者,结合18个古代猪和1500个现代猪的线粒体基因组信息,提供了迄今为止最为全面的亚洲家猪驯化历史图景,从多角度阐释了中国及东亚家猪的驯化历史,揭示多个现存且分布广泛的野猪支系自始至终没有对家猪有遗传上的贡献。王志等(2012)通过猪化石古DNA研究黄河流域家猪的驯化历史,得出黄河流域也存在家猪的驯化中心,只是还不确定具体位置。

李有恒、韩德芬(1978)对广西甑皮岩遗址动物群古生物学研究发现遗址中存在驯养

猪化石样本, 年代早于中国其他地区遗址中驯养猪化石样本, 所处年代大约在9 ka前, 认为该地区的家猪是独立驯化的。Larson et al. (2010)通过对线粒体基因组高变控制区序列的研究构建了东亚地区家猪起源和迁移模式, 认为东亚存在6个家猪驯化中心。其中所说的中国内陆家猪驯化中心不包括广西、广东和云南等地区, 因此对于广西地区家猪的起源还没有分子生物学证据表明其是独立驯化。本研究选取了广西地区30个猪化石样本, 直接从古代野猪化石中获取其线粒体基因组的细胞色素b (cytochrome b, cyt b)基因序列, 利用古DNA信息克服时间的束缚, 综合GenBank数据库中猪的同源序列, 进行系统发育分析, 为揭示我国广西地区家猪的起源驯化过程提供新的分子生物学证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究中野猪(*Sus scrofa*)化石样品分别采自广西壮族自治区南宁市武鸣县楼山洞(23°14'53"N, 108°22'51"E)、崇左市木榄山双坛洞(22°17'22"N, 107°30'49"E)和崇左市弄巴山洞(22°15'14"N, 107°31'22"E)三个地点(图1)。对楼山洞及弄巴山洞内钙板样品进行不平衡铀系法得到的测年结果分别为距今1.3~2.4万和3~5万年; 依双坛洞动物群中出现亚洲象(*Elephas maximus*)、华南巨貘(*Megatapirus augustus*)、晚期智人(*Homo sapiens*)和野猪(*Sus scrofa*)等进步属种判定其时代应为晚更新世。三个地点的样品都不超过古DNA 10万年的理论保存年限(Hofreiter et al., 2001; Willerslev et al., 1999), 样品具体信息见表1。

1.2 引物设计合成

从NCBI (美国国立生物技术信息中心)搜索到猪科动物cyt b基因全序列, 登录号为AY692029。使用Primer Premier 5软件(翟中会等, 2008)设计了10对扩增引物, 目标片段长度为100~145 bp (含引物序列); 通过OLIGO 7软件对引物二聚、退火温度和GC含量等进行了评估(Barnard et al., 1994; Rychlik, 2007), 引物由南京金斯瑞生物科技有

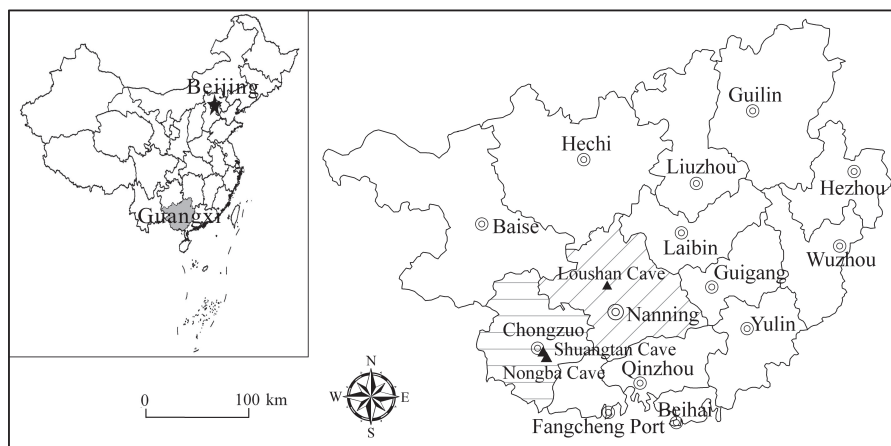


图1 采样地点

Fig. 1 Location of sampling sites

表 1 广西野猪牙齿化石样品基本信息

Table 1 The basic information of *Sus scrofa* tooth fossils from Guangx

样品编号Sample Number	年代 Age	采样地点 Locality
LSD-01~15	13~24 ka	Loushan Cave, Wuming
CMLST-0911-205-01~06	30~50 ka	Shuangtan Cave, Chongzuo
CMLST-0911-304-01, 02	30~50 ka	Shuangtan Cave, Chongzuo
CMLST-0911-328	30~50 ka	Shuangtan Cave, Chongzuo
CMLST-0911-321	30~50 ka	Shuangtan Cave, Chongzuo
CMLST-0911-385-01, 02	30~50 ka	Shuangtan Cave, Chongzuo
CSN-0811-015	Late Pleistocene	Nongba Cave, Chongzuo
CSN-0811-137	Late Pleistocene	Nongba Cave, Chongzuo
CSN-0811-201	Late Pleistocene	Nongba Cave, Chongzuo

限公司合成。

1.3 样品前处理与DNA提取

样品前处理在专用超净工作台进行。提取前先将化石样品放入盛有10%次氯酸钠溶液中浸泡10 min (Krings et al.,1997; MacHugh et al., 2000), 除去样品表面附着的杂质, 用一次性石墨砂轮打磨除去样品表面杂质后, 再用一次性不锈钢砂轮切割样品; 放入研钵中充分研磨成粉末。实验过程中使用的研钵需经过次氯酸钠浸泡、清水冲洗和紫外灯照射等步骤去除外源DNA的污染; 样品处理过程中及时更换手套、砂轮等耗材以避免样品之间的交叉污染。每批样品处理完以后在通风橱内用10%次氯酸钠溶液擦拭并保持紫外线照射至少24 h。

古DNA提取: 每个样品取250 mg骨粉, 按照盛桂莲等(2009)的方法进行提取。提取过程以无菌水作为空白提取对照, 并将其作为PCR阴性对照模板, 以监测实验过程中有来自实验者本人、实验试剂及耗材的外源DNA污染及样品间的交叉污染。

1.4 PCR扩增与纯化

古DNA大多以痕量、高度片段化的方式存在(Kuch et al., 2002)。为了提高扩增成功率, 本实验采用多重PCR扩增方法(Krause et al., 2006)。PCR反应体系总量为20 μ L, 包括2 μ L 10 $\times$ PCR buffer, 2.8 μ L MgCl₂ (25 mM), 2.0 μ L BSA (10 mg/mL), 0.5 μ L dNTPs (10 nmol/L), 0.15 μ L Taq酶(5U), 每条引物浓度为250 nmol/L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C, 9 min $\rightarrow$ (94 $^{\circ}$ C, 25 s $\rightarrow$ 51 $^{\circ}$ C, 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 35 s) $\times$ 30 cycles $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 10 min $\rightarrow$ 10 $^{\circ}$ C, 4 h $\rightarrow$ end。选取目标条带清晰、空白对照均为阴性的PCR扩增产物, 用2%的琼脂糖凝胶电泳切胶回收, 用胶纯化试剂盒(QIAGEN, 德国)进行纯化。

1.5 克隆及测序

将纯化所得片段连接到PMD-18T (Takara, 日本)载体上, 4 $^{\circ}$ C过夜, 连接产物转化至感受态细胞JM109, 再涂布到含氨苄青霉素、IPTG和X-Gal的LB固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C过夜培养。在4 $^{\circ}$ C冰箱中显色后从每个平板上挑选8个白色菌斑于37 $^{\circ}$ C振荡培养,

取1 μL菌液稀释后, 95℃加热10 min, 再取5 μL的煮沸液为模板用M₁₃引物扩增, 电泳检测挑选含目标序列的克隆产物, 送南京金斯瑞生物科技有限公司进行测序。测序结果用Chromas2.23软件查看并核对, 将读取错误的碱基修正。输出测序序列, 供下一步数据分析使用。

1.6 数据分析

从GenBank中检索已发表的家猪和野猪线粒体cyt b基因序列232条, 通过BioEdit软件(Tippmann, 2004)对现生猪序列与古代猪同源序列进行对位排列并辅以手工校正。使用MEGA5.05软件(Tamura et al., 2011)进行比对分析, 利用Network4.600软件(Bandelt et al., 1999)构建Median-Joining Network网络图。

2 结果与分析

2.1 古DNA提取及PCR扩增结果

广西壮族自治区三个地点的30个样品中, 从12个样品得到阳性扩增结果, 占总样品数的40% (图2)。其中武鸣楼山洞、崇左木榄山双坛洞和弄巴山洞样品的古DNA成功率分别为33%, 33%和100%。在重复性实验中, 4个样品中的部分或全部序列能得到与第一次提取和扩增相同的序列结果, 而其他8个样品虽经多次条件优化和重复均未得到可供验证的实验结果。从扩增序列的连续性来看, 从5个样品得到了连续两条引物的扩增产物。从合成引物的有效扩增率来看, 10对引物中有8对分别从不同样品中得到了扩增

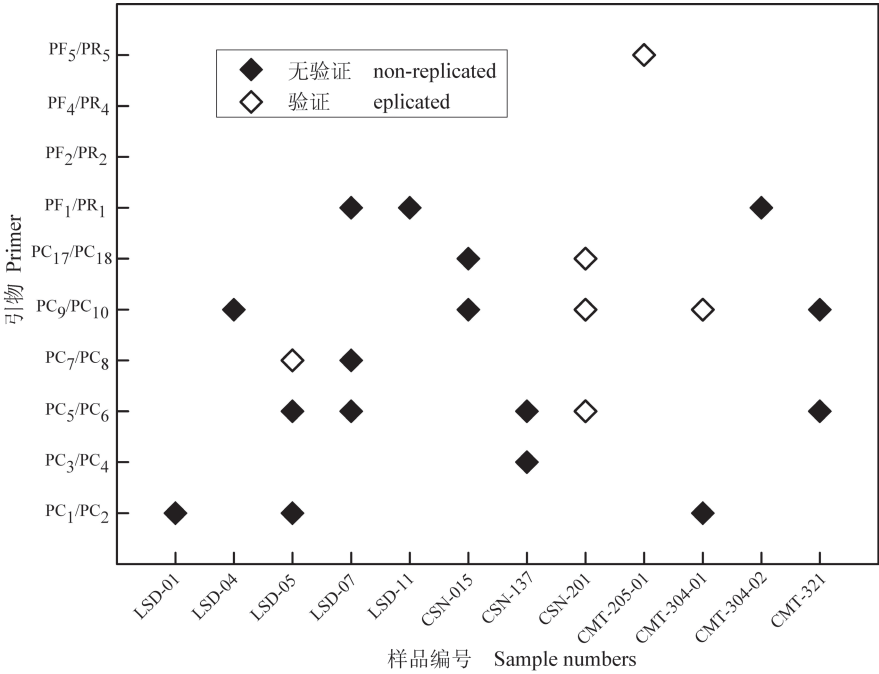


图2 样品扩增情况
Fig. 2 PCR results of 12 samples

产物，引物的扩增成功率达80%。

2.2 线粒体DNA变异与单倍型分析

在能获得序列的12个样品中，由于扩增效果不理想，能够重复验证的扩增片段很少(图2)，最多能从5个样品中得到同源序列(引物对PC5/PC6和PC9/PC10的扩增产物)，其中最长序列只有90 bp。为保证序列来源的可靠性并克服短序列效应，选取单个序列长度最长的样品CSN-201的189 bp序列片段(引物对PC9/PC10和PC17/18的扩增产物)，结合232个GenBank上的cyt b同源序列进行比对分析(表2)，共发现12个变异位点，其中单一变异位点(singleton variable sites) 3个，简约信息位点(parsimony informative sites) 9个。据此，对所分析序列定义了15个单倍型，分别命名为H1~H15 (表2)。单倍型H1和H2为主要单倍型，崇左弄巴山洞的古代样品CSN-201属于主单倍型H1。

表 2 所有样品189 bp序列的变异位点

Table 2 Variable position based on 189-bp fragment

单倍型 Haplotype	变异位点Variable position											
	147	186	196	207	216	394	408	420	426	432	444	468
H1	G	T	G	T	C	G	A	C	A	G	T	C
H2	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	-	-	-	C	-	-	-	-	G	-	-	-
H4	-	-	-	C	T	-	-	-	-	A	-	-
H5	-	-	A	C	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	A	-	-	C	-	A	-	-	-	-	-	-
H7	A	-	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-
H8	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-
H9	-	-	-	C	-	-	-	-	-	A	-	T
H10	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H11	-	-	-	C	T	-	-	-	-	A	-	-
H12	-	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H13	-	-	-	C	-	-	-	T	-	-	-	-
H14	-	-	-	C	-	-	-	-	-	-	C	-
H15	-	-	-	C	-	-	G	-	-	-	-	-

2.3 Network网络图分析

利用简约Median-Joining Network方法分析所选现代家猪、野猪序列及崇左弄巴山洞古代猪样品CSN-201线粒体基因组cyt b基因189 bp的同源序列，生成简约网络图(图3)。从图中可以看出主单倍型H1和H2包含了亚欧大陆及其附近岛屿所有猪种，主要由中国大陆家猪与欧洲野猪混合组成，两个主单倍型之间有直接联系。其中主单倍型H1主要由欧洲猪种构成，定义其为欧洲单倍型，所研究的样品CSN-201属于H1；主单倍型

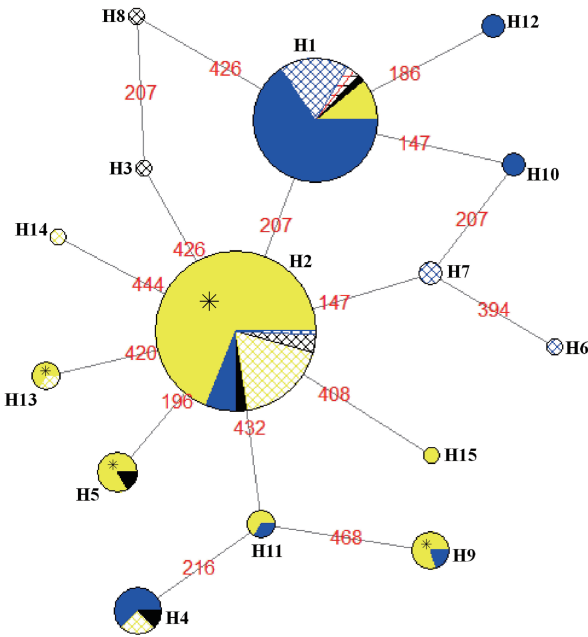


图 3 由古代猪与现代猪 mtDNA cyt b189 bp序列构建的Median-Joining Network网络图

Fig. 3 Median-Joining Network based on a 189-bp fragment of mitochondrial DNA cyt b gene depicting the relationships between ancient wild and modern domestic pigs

图中1个节点代表1个单倍型，节点的大小与单倍型频率成正比；实心代表家猪，网格形代表野猪，红色代表古代野猪，黄色代表中国大陆家猪，蓝色代表欧洲猪，黑色代表除中国大陆外的亚洲其他猪，星号标示广西家猪样品所处的单倍型位置，黑色数字代表单倍型编号，红色数字代表变异位点在序列中的位置

The haplotypes are symbolized by circles and are separated by one substitutional step. The size of circle is proportional to the frequency of haplotype. The solid and net circles represent the proportion of this frequency that is made up by domestic pigs and wild boars, respectively. Ancient Chinese wild boar, Chinese domesticated pigs, European pigs, and Asian except Chinese pigs are shown in red, yellow, blue, and black, respectively. The specimens from Guangxi are marked by asterisks. Black and red figures represent haplotype number and variable position, respectively

H2主要由亚洲猪种构成，定义其为亚洲单倍型，有很多分支与其他单倍型联系。意大利野猪独占H6和H7两个单倍型，单倍型H3和H8为日本野猪所独有。

3 讨论

3.1 古DNA序列的可靠性论证

古DNA是从经历了漫长地质年代的古生物化石材料中得到的。由于埋藏地环境因素的影响，DNA容易受到水解、氧化及微生物等作用而发生降解，使得其含量非常低并且高度片断化，在PCR扩增时容易发生来自现代样品的污染(Pääbo et al., 1989; Cooper and Poinar, 2000)。在本实验中，古代猪样品基因序列的原生性有以下保障：1) 从样品采集到存放实验室，均注意避免样品间的交叉污染；在整个实验操作过程中注意实验器材、耗材及试剂的灭菌。2) 从样品的处理到PCR反应液的配制，都在专用的古DNA实验室进行，且本实验室从未开展过现生猪科动物样品的研究。3) 每个样品至少进行

两次独立的提取操作,而且在每次提取过程中都设立提取空白对照组;在进行PCR操作时,设置PCR空白对照组,以监测样品间的交叉污染和外源DNA的污染。4) 数据分析所选取的序列,至少经过了两次独立PCR扩增和分子克隆重复实验,经BLAST查询确定为目标序列,并且所得结果一致。

3.2 广西地区猪科动物化石保存情况分析

目前进行古DNA研究的样品集中来自我国北方干燥、寒冷地区,很少涉猎我国南方,尤其是长江以南地区。在本研究中,我们成功扩增得到广西地区猪科动物化石的古DNA。但从图2所示的扩增结果来看,能够得到古DNA的样品比例较低,且经多次重复和实验条件优化后,均无法得到预期的较长且同源的古DNA拼接序列,且大部分序列片段不能在重复性实验中得到验证,可见该地保存的猪科动物化石中古DNA分子降解严重。究其原因,广西地区的气候温暖潮湿、年平均温度高,土壤湿度大、多呈酸性,这些因素都不利于古DNA的保存(杨周岐等, 2006)。此外,所研究的化石样品年代久远是该地样品古DNA降解的时间因素。

3.3 广西地区家猪驯化历史分析

家猪的家养驯化一直以来是人们关注的科学问题之一,前人通过研究提出了逐渐被众人所接受的多地区独立起源假说(Giuffra et al., 2000; Larson et al., 2005; Fang and Andersson, 2006; Wu et al., 2007)。在Network图中,欧洲家猪与欧洲野猪大部分共有同一单倍型,亚洲家猪与亚洲野猪大部分共有同一单倍型,说明欧洲和亚洲家猪分别由欧洲和亚洲野猪驯化而来,这也与Kim et al. (2002)和Fang and Andersson (2006)的研究结果一致。此外,欧洲单倍型H1中除了主要的欧洲现代家猪和野猪外,还包括中国大陆及东南亚家猪和少量东南亚野猪,欧洲类型与亚洲类型相互掺杂,不能在图中截然分开,反映出亚洲猪和欧洲猪彼此之间有基因交流与渗透(Jones, 1998; Giuffra et al., 2000; Kim et al., 2002; Fang and Andersson, 2006)。

我们研究的广西崇左弄巴山洞古代猪样品不在亚洲单倍型H2中,而是属于欧洲单倍型H1,结果显示广西古代野猪样品与现代欧洲猪亲缘关系更近。有研究表明,欧洲野猪的遗传变异受古代气候环境降温事件影响较大(Scandura et al., 2011),特别是在阿尔卑斯山玉木冰期(2.4万~1万年前)向间冰期的过渡阶段,由于温度上升,导致之前由于冰期退缩到避难所的种群在间冰期扩张,具有较广的分布范围,且由于生物与环境的协同演化逐渐形成现代不同类型的猪。其他物种也出现了相同的情形,像草地蝗虫(Hewitt, 1999)和高山蝶蛱(Sotiropoulos et al., 2007)等。且上文所说,欧洲家猪起源于欧洲当地野猪,因此推测,在广西古猪生活的年代(约3万~5万年前),欧洲古代野猪与广西古代猪的亲缘关系近,欧亚大陆野猪种遗传分异度低,欧亚野猪之间遗传分化很小,彼此之间有基因交流,所以出现Network网络图中所示的广西古代野猪与现存欧洲猪类聚为一类。

广西位于我国文化发源地之一的长江流域和湄公河流域之间,这两个地区被Larson et al. (2010)认为是家猪起源的两个不同中心。他们研究中所涉及的广西家猪样品聚为两类,一类归于湄公河流域分支,另一类归于中国大陆分支。由Network网络图显示广西地区家猪拥有多种单倍型,因此推测,广西地区的家猪可能是由不同地区的外来家猪在

人类的迁移过程中所引入的。且广西古代野猪样本与现代猪不具相同单倍型, 亲缘关系较远, 从而推测更新世时期的广西野猪对当地家猪的家养驯化可能没有遗传贡献。

我们通过对猪cyt b基因的研究, 证实了家猪多地独立起源学说, 并且发现广西地区古代野猪与欧洲现代猪亲缘关系较近, 推测其对该地区现代家猪的遗传贡献可能较低, 与李有恒、韩德芬(1978)通过考古形态学研究得出的广西地区家猪来自当地野猪的推测相左, 原因可能是我们所获得的古DNA片段较短, 提供的遗传信息有限, 希望今后能获得更多的样品, 得到完整的cyt b基因序列, 进而与当地家猪同源序列信息进行比较分析, 进一步揭示当地家猪的驯化历史。

致谢 中国科学院地球环境研究所蔡演军博士在洞穴年代测定中提供帮助, 中国科学院古脊椎动物与古人类研究所王元博士在采样和论文修改过程中也提供了很大帮助, 谨此致谢。

References

- Bandelt H J, Forster P, Rohl A, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*, **16**(1): 37–48
- Barnard R, Southard J N, Talamantes F, 1994. Two-step PCR amplification of multiple specific from cDNA using one specific primer and oligo (dT). *Biotechniques*, **16**: 251–252
- Cooper A, Poinar H M, 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science*, **289**: 1139
- Cui Y Q(崔银秋), Zhang X M(张雪梅), Tang Z W(汤卓伟) et al., 2010. Study of the origin of the pig by ancient mitochondrial DNA. *Res Chin Front Archaeol(边疆考古研究)*, **9**: 301–304(in Chinese with English abstract)
- Fang M, Andersson L, 2006. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. *Proc R Soc B*, **273**: 1803–1810
- Giuffra E, Kijas J M H, Amarger V et al., 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genet*, **154**: 1785–1791
- Hewitt G M, 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biol J Linn Soc*, **68**: 87–112
- Hofreiter M, Serre D, Poinar H N et al., 2001. Ancient DNA. *Nat Rev Genet*, **2**(5): 353–359
- Jones G F, 1998. Genetic aspects of domestication, common breeds and their origin. In: Rothschild M F, Ruvinsky A eds. *The Genetics of the Pig*. Wallingford, UK: CAB International. 17–50
- Kijas J M, Andersson L, 2001. A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. *J Mol Evol*, **52**(3): 302–308
- Kim K I, Lee J H, Li K et al., 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Anim Genet*, **33**(1): 19–25
- Krause J, Dear P H, Pollack J L et al., 2006. Multiplex amplification of the mammoth mitochondrial genome and the evolution of Elephantidae. *Nature*, **439**: 724–727
- Krings M, Stone A, Schmitz R W et al., 1997. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, **90**(1): 19–30
- Kuch M, Rohland N, Betancourt J L et al., 2002. Molecular analysis of an 11700-year-old rodent midden from the Atacama Desert, Chile. *Mol Ecol*, **11**(5): 913–924

- Larson G, Dobney K, Albarella U et al., 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*, **307**: 1618–1621
- Larson G, Albarella U, Dobney K et al., 2007. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proc Nat Acad Sci, USA*, **104**: 15276–15281
- Larson G, Liu R, Zhao X et al., 2010. Patterns of East Asian pig domestication, migration, and turnover revealed by modern and ancient DNA. *Proc Nat Acad Sci, USA*, **107**: 7686–7691
- Li X Y(李相运), 1998. The origin and domestication of pigs. *J Anim Sci Vet Med(畜牧兽医杂志)*, **17**: 15–19(in Chinese)
- Li Y H(李有恒), Han D F(韩德芬), 1978. The ruins fauna from Zhenpiyan at Guilin, Guangxi. *Vert PalAsiat(古脊椎动物学报)*, **16**(4): 244–254(in Chinese)
- MacHugh D, Edwards C J, Bailey J F et al., 2000. The extraction and analysis of ancient DNA from bone and teeth: a survey of current methodologies. *Anc Biomol*, **3**: 81–102
- Pääbo S, Higuchi R G, Wilson A C, 1989. Ancient DNA and the polymerase chain reaction—the emerging field of molecular archaeology. *J Biol Chem*, **264**: 9706–9712
- Rychlik W, 2007. OLIGO 7 primer analysis software. *Meth Mol Biol*, **402**: 35–60
- Scandura M, Iacolina L, Apollonio M et al., 2011. Genetic diversity in the European wild boar *Sus scrofa*: phylogeography, population structure and wild x domestic hybridization. *Mammal Rev*, **41**: 125–137
- Sheng G L(盛桂莲), Lai X L(赖旭龙), Hou X D(侯新东), 2009. Standard experimental system and new technologies on ancient DNA research. *Chin J Biochem Mol Biol(中国生物化学与分子生物学报)*, **25**(2): 116–125(in Chinese with English abstract)
- Sotiropoulos K, Eleftherakos K, Dzukic G et al., 2007. Phylogeny and biogeography of the alpine newt *Mesotriton alpestris* (Salamandridae, Caudata), inferred from mtDNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, **45**: 211–226
- Tamura K, Peterson D, Peterson N et al., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*, **28**: 2731–2739
- Tippmann H F, 2004. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Brief Bioinform*, **5**: 82–87
- Wang Z(王志), Xiang H(向海), Yuan J(袁靖) et al., 2012. Exploring the origin of domesticated pigs in the Yellow River area using information from ancient DNA. *Chin Sci Bull(科学通报)*, **57**: 1011–1018(in Chinese with English abstract)
- Watanobe T, Ishiguro N, Okumura N et al., 2001. Ancient mitochondrial DNA reveals the origin of *Sus scrofa* from Rebun Island, Japan. *J Mol Evol*, **52**(3): 281–289
- Watanobe T, Ishiguro N, Nakano M et al., 2002. Prehistoric introduction of domestic pigs onto the Okinawa Islands: ancient mitochondrial DNA evidence. *J Mol Evol*, **55**(2): 222–231
- Watanobe T, Ishiguro N, Nakano M et al., 2004. Prehistoric Sado Island populations of *Sus scrofa* distinguished from contemporary Japanese boar by ancient mitochondrial DNA. *Zool Sci*, **21**(2): 219–228
- Willerslev E, Hansen A J, Christensen B et al., 1999. Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice. *Proc Nat Acad Sci, USA*, **96**: 8017–8021
- Wu G S, Yao Y G, Qu K X et al., 2007. Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia. *Genome Biol*, **8**: R245
- Yang Z Q(杨周岐), Zhang H Q(张虎勤), Zhang J(张金) et al., 2006. Degradative factor analysis of ancient DNA preserved in human bones. *J Fourth Mil Med Univ(第四军医大学学报)*, **27**(1): 90–92(in Chinese with English abstract)
- Zhai Z H(翟中会), Chen X N(陈希南), Wang J(王娟) et al., 2008. Primer design with Primer Premier5.0. *Northwest Med Edu(西北医学教育)*, **16**(4): 695–698(in Chinese with English abstract)